

Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями

Т.А. Денисенко*, А.Б. Вишник, Л.П. Цыганок

Днепропетровский национальный университет им. Олеса Гончара, химический факультет, Украина, 49010, г. Днепропетровск, пр. Гагарина, 72

**Адрес для переписки: Денисенко Татьяна Александровна, E-mail: denisenko_tatyana@i.ua*

Поступила в редакцию 19 мая 2015 г., после исправлений – 2 июля 2015 г.

Сравнительное исследование реакции взаимодействия 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса (18-МФК) и реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ) с рядом представителей различных классов фенольных соединений свидетельствует о близости реакционной способности обоих реагентов, что позволяет использовать 18-МФК, наряду с реактивом ФЧ, для оценки общего содержания фенолов. Установлено, что 18-МФК является более активным окислителем по отношению к фенолам, вследствие чего в сравнении с реактивом ФЧ интервал оптимальных значений pH сдвинут в более кислую область, скорость реакции выше, а используемая концентрация реагента на порядок меньше. Обнаружено, что при использовании обоих реактивов и измерении оптической плотности в максимуме поглощения гетерополисини (ГПС) градуировочные зависимости являются нелинейными. Возможной причиной этого служит изменение состава и глубины восстановления гетерополикомплекса (ГПК) при изменении соотношения ГПК : фенол. В спектрах ГПС, получаемых при восстановлении 18-МФК, имеется изобестическая точка ($\lambda = 900$ нм), что позволило получать строго прямолинейные градуировочные зависимости. При использовании 18-МФК влияние восстанавливающих сахаров, простых фенолов, сульфит-ионов, витаминов и некоторых других соединений на результат определения фенольных соединений становится намного меньшим. На примере определения рутина и аскорбиновой кислоты при совместном присутствии показано, что только при использовании 18-МФК удается определять отдельно в смеси фенол и более активный восстановитель путем варьирования pH определения.

Ключевые слова: Реактив Фолина-Чокальтеу, 18-молибдодифосфат, спектрофотометрический анализ, определение фенолов.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 3, pp. 242-251

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.3.001

Reaction features of 18-molibdodiphosphate and Folin-Ciocalteu reagent with phenolic compounds

T.A. Denisenko*, A.B. Vishnikin, L.P. Tsiganok

Faculty of Chemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, 72, Gagarin pr., Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine

**Corresponding author: Tatyana A. Denisenko, E-mail: denisenko_tatyana@i.ua*

Submitted 19 May 2015, received in revised form 2 July 2015

The comparative investigation of a reaction between 18-molybdophosphate heteropoly complex (18-MPC) and Folin-Ciocalteu reagent (FCR) with a diversity of the representatives of different phenolic compounds classes shows a similar reaction behavior for both reagents. This evidence can be used for the application of 18-MPC along with FCR for the evaluation of total content of phenols. It was established that 18-MPC is more active as an oxidizing agent with respect to phenols and for this reason in comparison with FCR the range of optimal values of pH is displaced into the more acidic region, the reaction rate is higher, and the concentration of the reagent is one order of magnitude less. It was also discovered that by using both reagents and measuring the absorbance in absorption maximum of heteropoly blue (HPB), the graduation curves were nonlinear. The observed phenomenon was explained by the changes in the composition and depth of the HPB reduction occurring when changing the ratio between the heteropoly complex and the phenol. The isobestic point present in the absorption spectra of HPBs and which was acquired from 18-

MPC allows obtaining strictly linear calibration curves. By using 18-MPC the influence of reducing sugars, simple monophenols, sulphite ions, vitamins and some other compounds on the result of the determination of phenolic compounds becomes much smaller. It was shown by example of the ascorbic acid and rutin determination in the mixture that only by using 18-MPC it was possible to determine phenol and more active reducing agent separately by varying the pH of the determination.

Keywords: 18-molybdophosphate heteropoly complex, Folin-Ciocalteu reagent, spectrophotometric analysis, determination of phenols.

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные соединения – один из наиболее распространенных и многочисленных классов биологически активных веществ, содержащих ароматические кольца со свободной или связанной гидроксильной группой. Они в значительных количествах содержатся в растениях, овощах, фруктовых соках и напитках. Среднее потребление полифенолов в день составляет около 1 г, что в 10 раз больше, чем витамина С, в 100 раз больше, чем витамина Е и в 500 раз больше, чем каротиноидов [1]. Полифенолы оказывают на организм человека противопалительное, антигистаминное, антиоксидантное, противоотечное и противораковое действие, стабилизируют клеточные мембраны, тормозят процессы старения, положительно влияют на функцию сердечно-сосудистой системы [2]. Высокая физиологическая активность и низкая токсичность фенольных соединений природного происхождения обуславливает их широкий спектр использования в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности.

Основная часть фенольных соединений, присутствующих в растениях, может быть представлена тремя группами: С6–С1 – оксибензойные кислоты (рис. 1, а), С6–С3 – оксикоричные кислоты (рис. 1, б) и кумарины (рис. 1, в), С6–С3–С6 – флавоноиды [3]. Флавоноиды в свою очередь делят на две основные подгруппы: производные флавона (рис. 2, а), к которым относятся флавонолы, дигидрофлавонолы, флаваноны, изофлавоноиды, неофлавоноиды и производные флавана (рис. 2, б) – катехины (флаван-3-олы), лейкоантоцианидины (флавандиолы-3,4) и антоцианидины. Помимо простых фенольных соединений в растениях в значительных количествах содержатся также полимерные полифенолы. К ним принадлежат танины, лигнины и меланины [4].

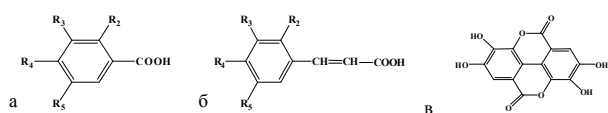


Рис. 1. Структурные формулы оксибензойных (а) и оксикоричных (б) кислот, эллаговой кислоты (в)

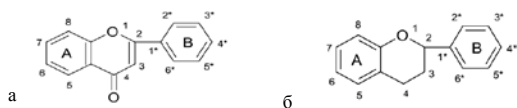


Рис. 2. Структурные формулы флавонов (а) и флаванов (б)

Большое разнообразие фенольных соединений и различия в их реакционной способности обуславливают потребность в широком арсенале методов их определения [5-7]. Основными методами определения индивидуального состава полифенольных соединений в лекарственных растениях являются газовая и, в особенности, высокоэффективная жидкостная хроматография или их комбинация с масс-спектрометрией [8-9], а также капиллярный электрофорез [10]. Эти методы требуют дорогого и сложного оборудования, специальной пробоподготовки (экстракция или дериватизация) и, как результат, малоприменимы для рутинного анализа.

В то же время существует значительное различие в общем содержании фенолов, найденном спектрофотометрически с применением реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ) и методом ВЭЖХ [11-12]. С одной стороны, это объясняется тем, что анализ методом ВЭЖХ часто включает определение ограниченной группы фенольных соединений, поскольку коммерческие стандарты могут быть недоступны, а структура некоторых представителей из многочисленной группы полифенолов остается неустановленной. С другой стороны, обычно не учитывается содержание танинов, фенольных дитерпенов и летучих фенольных соединений. Кроме того, следует принимать во внимание, что спектрофотометрические методики определения фенолов являются ограниченно селективными, что приводит к завышенной или заниженной оценке содержания полифенолов. Необходимо также учесть, что при использовании методов молекулярной спектроскопии при определении суммы фенолов важную роль играет выбор стандарта. При этом различия в величинах условных молярных коэффициентов и реакционной способности фенольных соединений (даже при правильном выборе стандарта) приводят к весьма значительной вариативности в результатах определения.

Спектрофотометрические (СФ) методики занимают особое место при определении полифенольных соединений благодаря их простоте, экспрессности, высокой чувствительности, способности давать интегральную оценку тех или иных показателей. Предложены СФ методики, основанные на собственном поглощении полифенолов в ближней УФ и видимой части спектра [10], а также на применении реактива Фолина-Дэнниса (ФД) или Фолина-Чокальтеу [13], ионов металлов (Al (III) [14]) или их комплексных соединений [15-16].

Реактивы ФЧ и ФД используют в качестве стандартных реагентов для спектрофотометрического

определения суммы фенольных соединений. Их иногда ошибочно относят к гетерополикомплексам (ГПК) структуры Кеггина (рис. 3, а) [17]. Однако, начиная с работ Ву [18], было показано, что эти вещества относятся к другому классу ГПК, структура которого была впервые расшифрована Доусоном (рис. 3, б) [19]. Формально её можно представить, как результат объединения двух гетерополианионов (ГПА) Кеггина $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$, у каждого из которых предварительно удалён триплет октаэдров Mo_3O_9 (рис. 3). Реактив ФЧ (ФД) представляет собой смесь молибдовольфраматовых ГПК структуры Доусона (**18-МВФК**). В составе смеси преобладают члены ряда разнолигадных ГПА, содержащих 4-5 атомов молибдена. Формула ГПА может быть представлена в следующем виде $\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}^{6-}$ ($n = 4-5$) [20]. В составе реактива ФД присутствуют только натриевые соли, а в реактив ФЧ [13] на стадии синтеза вводят соли лития (I) с целью предотвращения образования малорастворимых солей в ходе анализа.

Отнесение молибдовольфраматовых ГПА, составляющих основу реактива ФЧ, к доусоновским комплексам косвенно подтверждается способом синтеза. Известно, что в то время как ГПА Кеггина образуются при комнатной температуре, получение ГПА Доусона требует длительного кипячения раствора [19]. Кроме того, ГПА Кеггина практически мгновенно разрушаются с образованием фосфата и молибдата (вольфрамата) при подщелачивании раствора. В противоположность этому щелочной гидролиз ГПК структуры Доусона происходит довольно медленно. Доусоновские ГПА обладают существенно более высоким, примерно на 0.2 В более положительным окислительно-восстановительным потенциалом. Молибденовые или молибдовольфраматовые ГПА структуры Кеггина ($\text{PMo}_n\text{W}_{12-n}\text{O}_{40}^{3-}$) являются весьма слабыми окислителями и не способны окислять фенолы, а реакция даже с сильными восстановителями (аскорбиновая кислота, цистеин) требует нагревания раствора.

Метод определения фенолов, основанный на использовании реактива ФЧ (ФД), обладает достаточно высокой чувствительностью, надёжностью, воспроизводимостью получаемых результатов. Однако при использовании реактива ФЧ возникает ряд проблем.

Доусоновские ГПА ограниченно устойчивы в интервале $\text{pH} = 0-2$, при более высоких значениях pH скорость реакции гидролиза увеличивается [21]. В щелочной среде происходит постепенное разрушение как окисленной, так и восстановленных форм ГПА. Чтобы замедлить нежелательные процессы, в реакции используются высокие концентрации реактива ФЧ. Это приводит к большому расходу реактива и попаданию сравнительно больших количеств токсичных солей молибдата и вольфрамата в окружающую среду.

Реактив ФД (ФЧ) способен вступать в реакцию взаимодействия, как с более сильными, чем поли-

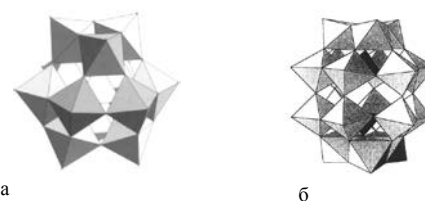


Рис. 3. Гетерополианионы структуры Кеггина $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ [29] и Доусона $[\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$ [30]

фенолы, восстановителями (аскорбиновая кислота, сероводород, SO_2 , ионы железа (II) или тиолы), так и с менее реакционноспособными веществами (простые фенолы, многие аминокислоты и амины, оксикислоты, протеины, ксантины, восстанавливающие сахара). Это способно привести к искаженной оценке антиоксидантной активности, пищевой полезности и других комплексных показателей.

Из других отрицательных сторон реактива ФД (ФЧ) можно отметить недостаточно высокую скорость реакции, особенно в области pH , близкой к нейтральной, образование нерастворимых веществ с компонентами анализируемого образца, в частности, при использовании спиртов для извлечения полифенолов из растительной матрицы, что приводит к сильному понижению растворимости натриевых солей ГПА, входящих в состав реактива ФЧ, нелинейность градуировочной функции, необходимость работать в сильнощелочной области.

Целью данной работы являлось установление особенностей взаимодействия и реакционной способности реактива ФЧ и 18-молибдодифосфата (**18-МФК**) по отношению к фенольным соединениям и другим веществам, проявляющим восстановительные свойства, а также выбор оптимальных условий определения различных классов фенолов с использованием 18-МФК в качестве реагента.

Исследование реакционной способности 18-МФК и реактива ФЧ проведено на модельных соединениях и является основой для интерпретации возможных расхождений или совпадений результатов анализа реальных объектов. Предлагаемая методика на основе 18-МФК может быть использована как для определения суммы фенольных соединений, так и отдельных представителей полифенолов или их групп. Ее апробация для определения суммы фенольных соединений в растительных объектах, а также сравнение результатов, полученных с использованием 18-МФК, реактива ФЧ, AlCl_3 являются предметом следующей публикации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Исходные растворы фенольных соединений с концентрацией 10^{-3} моль/л готовили растворением рассчитанной навески в 10 мл 96 % этилового спирта при нагревании ($50-60^\circ\text{C}$). Для приготовления фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 7.4$) в колбу на 1000 мл вносили 71 мл 0.067 моль/л раствора KH_2PO_4 и доводили до метки 0.067 моль/л

раствором Na_2HPO_4 . Боратный буферный раствор с $\text{pH} = 9.5$ готовили в колбе на 100 мл. В нее вносили 79 мл 0.05 моль/л раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и доводили до метки 0.01 моль/л раствором NaOH . Для приготовления 20 % раствора карбоната натрия взвешивали 20 г Na_2CO_3 (б/в), растворяли в дистиллированной воде при нагревании, доводили до метки в колбе на 100 мл.

Реактив Фолина-Чокальтеу синтезировали в соответствии с методикой [13]: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 700 мл воды, прибавляли 50 мл 85 %-ной H_3PO_4 и 100 мл HCl , кипятили с обратным холодильником в течение 10 часов. После в раствор вносили 150 г Li_2SO_4 и 3-4 капли Br_2 , излишек которого удаляли кипячением без холодильника в течение 15 минут. Смесь охлаждали и разбавляли водой до 1 л. Учитывая то, что для синтеза реактива ФЧ ортофосфат-ионы берутся в избытке, в пересчёте на молибден концентрация ГПК составляет примерно 0.02 моль/л.

$(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62} \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (18-МФК) синтезировали согласно методике [22]. Водный раствор 18-МФК с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л готовили растворением 392.7 мг 18-МФК в 25 мл дистиллированной воды.

Определение суммы фенолов с использованием реактива ФЧ [13]. В колбе объёмом 50 мл смешивают 25 мл исследуемого раствора, 5 мл реактива ФЧ, 15 мл 20 % раствора Na_2CO_3 , доводят дистиллированной водой объём до метки. Через 20 минут измеряют оптическую плотность при 760 нм.

Определение суммарного содержания флавонолов с использованием уменьшенной концентрации реактива ФЧ. В колбе объёмом 25 мл смешивают исследуемый раствор, 0.3 мл реакти-

ва ФЧ, 3 мл 20 % Na_2CO_3 , разбавляют водой до метки. Через 20 минут измеряют оптическую плотность при 720 нм.

Определение суммы флавоноидов с использованием 18-МФК. В мерную колбу на 25 мл вносят аликвоту исследуемого раствора, 0.8 мл $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л 18-МФК, 5 мл фосфатного буферного раствора с $\text{pH} = 7.4$, доводят объём дистиллированной водой до метки. Оптическую плотность измеряют через 10 минут при 820 нм. При определении фенольных соединений при $\text{pH} = 9.5$ вводят 3 мл боратного буферного раствора.

Спектры поглощения в УФ и видимой областях измеряли при помощи спектрофотометра СФ-26. pH контролировали на иономере ЭВ-74 с использованием индикаторного стеклянного электрода и хлорид-серебряного электрода сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Особенности взаимодействия реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями.

Взаимодействие реактива ФЧ с фенольными соединениями происходит в широком интервале кислотности (рис. 4). Глубина окисления фенолов закономерно увеличивается при смещении pH в щелочную область.

Достаточно высокая скорость реакции и, как следствие, полнота взаимодействия ФЧ с фенольными соединениями достигаются только в сильно-щелочной среде ($\text{pH} = 11.4$). Для полного окисления даже наиболее активных полифенолов требуется продолжительное время. Так, для кверцетина светопоглощение перестаёт увеличиваться после 10 минут взаимодействия, а для рутина – после 30 минут. Наличие в объекте анализа менее реакционноспособных фенольных соединений требует увеличения времени проведения реакции. При этом чаще всего ограничиваются компромиссным временем 20-30 минут.

На кривой зависимости светопоглощения ГПС от кислотности раствора практически отсутствует участок с постоянной оптической плотностью, что требует точного контроля pH раствора.

При исследовании реакции восстановления реактива ФЧ рутином, эпигаллокатехингаллатом, галловой кислотой и другими восстановителями обнаружено, что вид спектров поглощения существенно зависит не только от pH , но и от соотношения концентраций реактив ФЧ: фенол (рис. 5, а). При увеличении доли фенола максимум светопоглощения смещается от 760-780 нм до 660-680 нм, а также существенно снижается интенсивность поглощения.

Можно предположить, что в данной системе при изменении соотношения ГПА / фенол происходит образование, по крайней мере, двух форм ГПС. В большом избытке реагента преимущественно

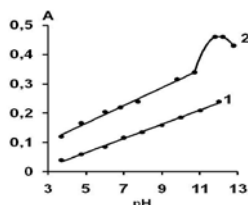


Рис. 4. Влияние pH раствора на образование 18-МВФС при взаимодействии кверцетина (1) и рутина (2) с реактивом ФЧ ($\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см, $t = 15$ мин): 1 – $C_{\text{кв}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ФЧ}} \approx 2.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 2 – $C_{\text{рутин}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ФЧ}} \approx 2.4 \cdot 10^{-3}$ моль/л

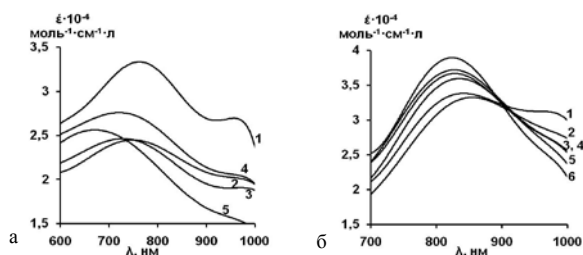


Рис. 5. Спектры поглощения гетерополисиней, полученных при окислении ЭГКГ реактивом ФЧ (а) и 18-МФК (б) ($l = 1$ см, $t = 15$ мин). а – $C_{\text{ФЧ}} = 2.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $\text{pH} = 11.4$, $C_{\text{ЭГКГ}}$ мкмоль/л: 1 – 2.2; 2 – 8.8; 3 – 18; 4 – 26; 5 – 35; б – $C_{\text{18-МФК}} = 1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $\text{pH} = 9.5$, $C_{\text{ЭГКГ}}$ мкмоль/л: 1 – 4.4; 2 – 8.8; 3 – 13; 4 – 18; 5 – 26; 6 – 31

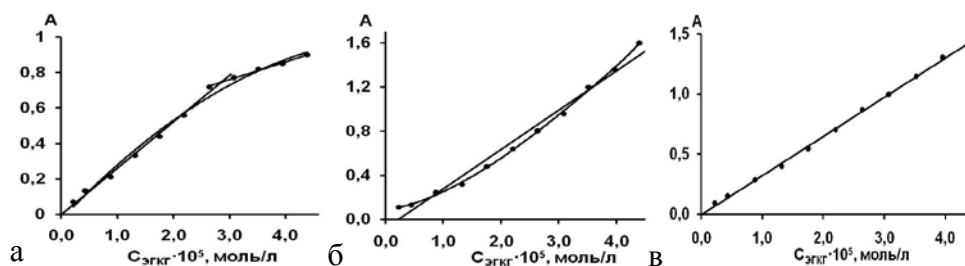
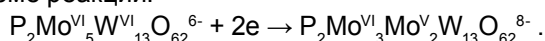


Рис. 6. Градуировочные зависимости для определения ЭГКГ реактивом ФЧ (а) и 18-МФК (б, в) ($l = 1$ см, $t = 15$ мин). а – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $\text{pH} = 11.4$, $\lambda = 720$ нм; б, в – $C_{18\text{-МФК}} = 1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $\text{pH} = 9.5$, $\lambda = 820$ нм (б) и $\lambda = 900$ нм (в)

образуется двухэлектронная ГПС с максимумом поглощения при 760–780 нм согласно следующей схеме реакции:



Это предположение косвенно подтверждается тем, что максимум поглощения данной ГПС находится в той же области спектра, что и полосу двухэлектронной 18-молибдофосфорная синь (18-МФС-2, $\lambda_{\text{max}} = 820$ нм). Электронные переходы в этой области обусловлены переносом электрона $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$ [19]. Молярные коэффициенты двухэлектронных ГПС, получаемых из 18-МФК и 18-МВФК очень близки ($\sim 1.1 \cdot 10^4$ моль/(л·см)) [23]. Данные вольтамперометрии [20] также подтверждают это предположение. Первая волна восстановления ГПА ($\text{pH} = 1$) $\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}^{6-}$ ($n_{\text{Mo}} = 4, 5, 6$) соответствует образованию двухэлектронной 18-МВФС ($E = +0.5$ В отн. НКЭ). Второй двухэлектронный процесс наблюдается лишь при $E = -0.1$ В.

При увеличении соотношения фенол : 18-МВФК равновесие реакции смещается в сторону образования четырёхэлектронной ГПС. При уменьшении доли атомов Mo^{VI} в ГПА растёт вклад электронных переносов $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{W}^{\text{VI}}$, для которых характерно наличие полосы поглощения при $\lambda = 500\text{--}520$ нм [19]. Смещение максимума полосы поглощения от 760 нм до 660–680 нм связано с образованием в растворе смеси двух разных форм ГПС.

Для определения флавонолов можно использовать на порядок меньшую, чем в стандартной методике, концентрацию реактива ФЧ ($C_{\text{ФЧ}} \approx 2.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Это не препятствует полному окислению флавонолов, а скорость реакции остаётся достаточно высокой.

Всё же градуировочный график в этом случае имеет отчётливо выраженный нелинейный характер (рис. 6, а). Лишь его начальная часть может быть удовлетворительно аппроксимирована линейной зависимостью.

Уменьшение наклона градуировочной кривой ($\epsilon = 1.18 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ ·л) предположительно соответствует увеличению доли четырёхэлектронной ГПС, имеющей при 720 нм меньший, чем у двухэлектронной 18-МФС-2, молярный коэффициент. При использовании концентрации реактива ФЧ, рекомендуемой в стандартной методике, степень нелинейности градуировочной функции уменьшается. В большом избытке реагента преобладает двухэлектронная ГПС с максимумом светопоглощения около 760 нм. Ра-

нее предлагалось строить градуировочные зависимости с использованием длин волн в диапазоне 725–760 нм [13].

2. Оценка реакционной способности 18-МФК по отношению к фенольным соединениям

Преодолеть указанные выше недостатки методики на основе реактива ФЧ можно, используя в качестве реагента 18-МФК, предложенный ранее для определения ряда восстановителей [22–26].

Ранее было установлено [23], что окислительно-восстановительный потенциал пары $0e$ 18-МФК / $2e$ 18-МФК при $\text{pH} > 4$ перестаёт зависеть от кислотности раствора и составляет около +0.57 В (отн. СВЭ). В зависимости от строения фенольных соединений величины их редокс-потенциалов находятся в интервале от +0.23 В до +0.75 В. Сила фенолов, как восстановителей, растёт при увеличении pH . Приведённые величины редокс-потенциалов свидетельствуют о том, что возможность и глубина взаимодействия фенолов с 18-МФК сильно зависят от pH раствора, что в свою очередь влияет на селективность определения.

Найдено, что независимо от структурных особенностей различных групп фенолов можно найти интервал pH , в котором наблюдается их количественное взаимодействие с 18-МФК (рис. 7).

При $\text{pH} < 3$ 18-МФК не взаимодействует со всеми изученными «растительными» фенолами (рис. 7). Образование окрашенных продуктов в реакции окисления флавонолов становится заметным при $\text{pH} > 5.5$ (крив. 1 и 2). Оптимальным для определения этих веществ можно считать интер-

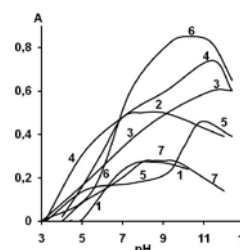


Рис. 7. Влияние pH раствора на образование ГПС при взаимодействии 18-МФК с фенолами. $C_{18\text{-МФК}} = 1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{полифенола}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм; $t = 15$ мин, $l = 0.5$ см: 1 – рутин, 2 – кверцетин, 3 – ЭГКГ, 4 – эллаговая кислота, 5 – хлорогеновая кислота, 6 – розмариновая кислота, 7 – галловая кислота

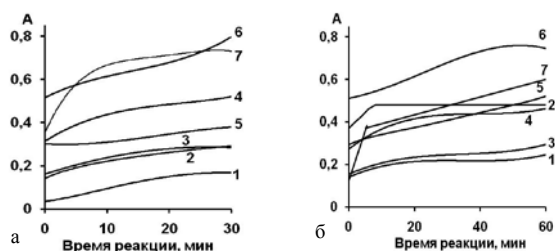


Рис. 8. Зависимость оптической плотности ГПС от времени реакции при pH = 7.4 (а) и 9.5 (б). $C_{18\text{-МФК}} = 1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{полифенола}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 0.5$ см: 1, а – рутин; 2, а – кверцетин; 1, б – ликвиритин; 2, б – гесперидин; 3 – ЭГКГ, 4 – эллаговая кислота, 5 – хлорогеновая кислота, 6 – розмариновая кислота, 7 – галлотанин

вал pH = 7-9, в котором наблюдается количественное образование ГПС и скорость реакции является сравнительно высокой (рис. 8). Ранее нами, как оптимальный, для определения флавонолов с 18-МФК был выбран pH = 7.4 [24, 26]. Было замечено, что на скорость реакции окисления кверцетина значительное влияние оказывает концентрация 18-МФК. Так, при концентрации 18-МФК $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л ГПС образуется спустя 10 минут, а при увеличении её до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л для полного окисления кверцетина требуется меньше одной минуты [26]. В случае рутина или морина изменение концентрации реагента влияет намного меньше.

При pH > 9 (рис. 7) почти для всех изученных систем наблюдается уменьшение интенсивности свтопоглощения, что связано с ускорением процесса разрушения окисленной и восстановленной форм 18-МФК. Использование большего избытка 18-МФК позволяет компенсировать потери реагента. Однако, использование высокой концентрации 18-МФК не всегда оправдано. Так, например, при pH = 9.5 окисление галлотанина 18-МФК с концентрацией $1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л заканчивается через 15 минут, а при увеличении концентрации 18-МФК до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л составляет 120 минут.

Для галловой кислоты (рис. 7, крив. 7) и её производных, таких как галлотанин, в интервале pH = 8-10 наблюдается площадка с постоянным значением оптической плотности. Для фенольных кислот, к примеру, эллаговой (крив. 4), розмариновой (крив. 6), феруловой, коричной, а также для катехинов (эпигаллокатехингаллат (крив. 3)) и теафлавина выбор pH осложнен отсутствием такой площадки. Особым является поведение хлорогеновой кислоты, окисление которой происходит в две стадии (крив. 5).

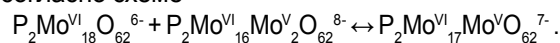
Окисление фенольных соединений, обладающих низкой реакционной способностью, таких как флавононы (гесперидин, ликвиритин) или простые фенолы (м-крезол), при pH < 9 практически не происходит. Но уже при pH = 9.5 в среде боратного буферного раствора через 15 минут после начала реакции успевает прореагировать их большая часть (~90 %). Это значение pH можно рекомендовать как оптимальное и для определения большинства дру-

гих классов фенолов. При определении простых монофенолов время реакции должно быть увеличено до 30 минут.

При построении градуировочных зависимостей (рис. 6, б) в большинстве случаев достаточно использовать концентрацию реагента $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Это значение на порядок меньше, чем в стандартной методике [13], использующей реактив ФЧ.

Ранее было показано [19, 24], что первым устойчивым продуктом реакции восстановления 18-МФК является двухэлектронная ГПС 18-МФС-2 формулы $P_2Mo^{VI}_{16}Mo^{V}_{2}O_{62}^{8-}$. При изменении pH от 2 до 5 максимум в спектре поглощения 18-МФС-2 смещается от 760 до 820 нм и далее при увеличении pH уже не изменяется, что свидетельствует о полной депротонизации ГПА.

Изменение соотношения концентраций 18-МФК: полифенол существенно влияет на вид спектра поглощения ГПС и в этой системе (рис. 5, б). В большом избытке реагента в длинноволновой области появляется плечо, возможно обусловленное смещением равновесия в сторону образования одноэлектронной ГПС согласно схеме



В спектрах поглощения имеется изобестическая точка при 900 нм, подтверждая тем самым предположение о переходе одной формы ГПС в другую. Учитывая это, чтобы обеспечить линейность градуировочной зависимости оптической плотности 18-МФС от концентрации восстановителя, измерения необходимо проводить не в максимуме свтопоглощения $\lambda = 820$ нм (рис. 6, б), а при длине волны, соответствующей изобестической точке (рис. 6, в). Градуировочная зависимость для определения ЭГКГ с 18-МФК описывается уравнением $A^{910} = 3.27 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{ЭГКГ}}$ $R^2 = 0.988$. Градуировочный график является строго линейным в широком интервале концентраций аналита и проходит через начало координат.

3. Сравнение химико-аналитических параметров методик определения фенолов, использующих реактив ФЧ и 18-МФК

В табл. 1 представлены условные молярные коэффициенты полифенолов, определенные при pH, выбранных ранее в качестве оптимальных, с использованием в качестве аналитических реагентов ФЧ и 18-МФК, а в табл. 2, при тех же условиях, оценена реакционная способность веществ, сопутствующих полифенолам в растительных объектах и проявляющих восстановительные свойства.

Из приведенных данных следует, что в большинстве случаев молярные коэффициенты в пересчете на полифенол, полученные с использованием обоих реагентов, близки друг к другу. Это отражает тот факт, что оба ГПК имеют родственную структуру и свидетельствует о том, что их реакционная способность принципиально не отличается. Однако в ряде случаев условные молярные

Таблица 1

Рассчитанные для различных представителей фенольных соединений величины условных молярных коэффициентов при различном времени реакции

Фенольные соединения		18-МФК				Реактив ФЧ
		$\varepsilon^{820} \cdot 10^{-4}$, моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л при pH = 7.4		$\varepsilon^{820} \cdot 10^{-4}$, моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л при pH = 9.5		$\varepsilon^{720} \cdot 10^{-4}$, моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л при pH = 11.4
		15 мин	30 мин	15 мин	30 мин	15 мин
Флавонолы	Кверцетин	5.5	5.5	5.5	5.5	3.85
	Морин	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
	Рутин	2.7	2.7	2.7	2.7	2.8
Фенольные кислоты	Галловая	2.1	–	3.2	–	2.7
	Эллаговая	3.8	4.5	4.0	5.0	6.0
	Хлорогеновая	1.7	2.0	1.8	2.2	2.5
	Розмариновая	5.8	7.0	6.4	8.0	8.0
Флавононы	Гесперидин	0.28	0.28	1.4	1.8	1.8
	Ликвиритин	0.015	0.02	0.17	0.17	0.17
Флаваны	ЭГКГ	3.65	4.0	3.73	5.0	2.46
Таннины	Галлотанин	7.0	–	24.0	–	14.0

Примечание: (–) – нет данных

Таблица 2

Оценка мешающего влияния фенолов нерастительного происхождения и сопутствующих веществ при определении «растительных полифенолов» реактивом ФЧ и 18-МФК (время реакции 15 минут)

Вещество	18-МФК		Реактив ФЧ
	ε^{820} , моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л		ε^{720} , моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л
	pH = 7.4	pH = 9.5	pH = 11.4
Пикриновая, лимонная, щавелевая, винная, сульфосалициловая и ацетилсалициловая кислоты, кофеин	–	–	–
Салициловая к-та	–	–	40
Глюкоза, фруктоза, мальтоза	–	–	5
о-крезол	–	–	–
п-крезол	–	–	600
м-крезол	–	400	800
Фенол	10	30	80
Пиридоксина гидрохлорид	20	20	1100
Тиамин хлорид	45	2500	42000
Фолиевая к-та	180	600	600
Тимол	450	1200	1200
Каптоприл хлорид	5500	5500	8000
Аскорбиновая к-та	12000	12000	10000
Пирогаллол карбоновая к-та	10000	28000	28000
Гидрохинон	15000	20000	28000

Примечание: (–) – вещество не реагирует с ГПК.

коэффициенты при использовании 18-МФК являются существенно более высокими, а следовательно выше будет и чувствительность таких методик в сравнении с реактивом ФЧ.

При pH < 11 реакционная способность полифенолов по отношению к ГПК, также как и других соединений, существенно снижается, иногда очень резко. Кроме того, скорость реакции со многими веществами резко уменьшается при понижении концентрации ГПК. На определение полифенолов с 18-МФК в этих условиях не оказывают влияния вы-

сокие концентрации восстанавливающих сахаров, простых монофенолов, сульфит-ионов, салициловой кислоты, витаминов В-группы и некоторых других веществ. Наличие указанных веществ в растительных объектах приводит к завышенной оценке содержания полифенолов при использовании реактива ФЧ. Оценка общего количества полифенолов с 18-МФК оказывается заниженной по сравнению с ФЧ в том случае, если в анализируемом объекте содержатся полифенолы, скорость реакции которых с

Таблица 3

Определение содержания аскорбиновой кислоты и рутина в искусственных смесях

Введено		Найдено ($\lambda = 820$ нм)				Найдено ($\lambda = 900$ нм)			
$C_{AK}, \mu M$	$C_{рутина}, \mu M$	$C_{AK} \pm \Delta, \mu M$	%	$C_{рутина} \pm \Delta, \mu M$	%	$C_{AK} \pm \Delta, \mu M$	%	$C_{рутина} \pm \Delta, \mu M$	%
10	10	13.4 ± 0.8	134	12.5 ± 0.5	125	10.4 ± 0.7	104	10.3 ± 0.4	103
20	10	22.9 ± 0.3	114	13.0 ± 0.5	130	19.8 ± 0.2	99	9.5 ± 0.4	95
40	10	38.8 ± 0.6	97	13.7 ± 0.3	137	38.4 ± 0.5	96	9.8 ± 0.2	98
80	10	75.1 ± 0.9	94	15.3 ± 0.7	153	81.5 ± 0.8	102	9.6 ± 0.5	96

18-МФК или ФЧ при $pH = 9.5$ и особенно $pH = 7.4$ значительно меньше, чем при $pH = 11.4$.

Определению полифенолов с реактивом ФЧ мешают высокие концентрации таких активных восстановителей, как аскорбиновая кислота [27]. Предложено учитывать вклад витамина С, измеряя его содержание хроматографическим методом или путем нагревания анализируемого образца в течение двух часов при $85^\circ C$, что значительно усложняет определение. Как видно из рис. 3, при использовании реактива ФЧ отсутствует область pH , где взаимодействие АК с реактивом было бы избирательным. Для 18-МФК удается без труда найти область pH , в которой полифенолы не мешают реакции ГПК с восстановителями различной природы (рис. 7). К примеру, при $pH < 5$ полифенолы не мешают окислению аскорбиновой кислоты. Примером этого служит определение рутина в образцах аскорутина, которое было осуществлено в две стадии [24]. Сначала определяли АК в среде ацетатного буферного раствора с $pH = 4.5$. Потом при $pH = 7.4$ определяли сумму АК и рутина. Содержание рутина соответствует тогда разности оптических плотностей двух опытов. Подобным образом может быть учтено содержание в растительных объектах или других образцах на их основе тиолов (цистеина, глутатиона) и других более активных, чем полифенолы, восстановителей.

В табл. 3 приведены результаты определения рутина и аскорбиновой кислоты в искусственных смесях. Использование нелинейных градуировочных зависимостей с аппроксимацией их уравнением прямой линии в случае измерения оптической плотности при 820 нм приводит к тому, что градуировочный график пересекает ось ординат при отрицательных значениях. В этом случае линеаризованные зависимости для АК и рутина описываются следующими уравнениями – $A = -0.104 \pm 0.034 + (1.050 \pm 0.036) \cdot 10^4 \cdot C_{AK}$ ($R^2 = 0.9904$) и $A = -0.056 \pm 0.011 + (1.718 \pm 0.025) \cdot 10^4 \cdot C_{рутин}$ ($R^2 = 0.9989$). В результатах определения даже одного вещества (аскорбиновая кислота, $pH = 4.5$) появляется статистически значимая систематическая погрешность. Концентрация рутина определяется по разности и здесь вносится еще большая положительная систематическая погрешность, вели-

чина которой при увеличении соотношения аскорбиновой кислоты к рутину растет вплоть до $\sim 50\%$. При использовании линейных градуировочных графиков ($\lambda = 900$ нм) общая погрешность определения, которая определяется только случайной составляющей, не превышает 2–4 %. Градуировочные графики описываются следующими уравнениями: $A = (1.834 \pm 0.017) \cdot 10^4 \cdot C_{рутин}$ ($R^2 = 0.9997$) и $A = (0.926 \pm 0.009) \cdot 10^4 \cdot C_{AK}$ ($R^2 = 0.9996$).

При использовании реактива ФЧ градуировочные графики являются нелинейными при любой длине волны, что приводит к появлению систематических погрешностей в результатах определения. При контроле общего содержания фенолов эта погрешность является несущественной, но при определении индивидуальных веществ или анализе смесей вносимая систематическая погрешность значимо превышает случайную.

Определение суммы фенольных соединений с 18-МФК позволяет в ряде случаев более точно соотнести получаемые интегральные показатели с общим содержанием полифенольных соединений, оценить антиоксидантную активность или пищевую полезность, учитывая, что данные показатели связаны в основном только с содержанием фенольных соединений. К примеру, простые сахара, большая часть аминокислот, простые фенолы или лимонная кислота не относят к антиоксидантам. В то же время эти вещества не окисляются 18-МФК [23], но вносят существенный вклад в результат определения антиоксидантной активности с реактивом ФЧ.

Методика с 18-МФК является более робастной. Условия проведения определения (pH , концентрация буферного раствора и реагента, время) намного меньше влияют на полученные результаты. В методике используются на порядок меньшие концентрации реагента, что позволяет снизить количество токсичных отходов и отвечает принципам «зеленой химии». Автоматизированные методики для определения фенолов на основе 18-МФК являются более простыми, производительными и чувствительными [22, 24–25]. В ряде случаев анализ становится намного более экспрессным, образование малорастворимых продуктов при использовании 18-МФК не отмечено.

ЛИТЕРАТУРА

- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols // *J. Nutrition*. 2000. V. 130, № 8. P. 2073-2085.
- Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications; Ed. O.M. Andersen, K.R. Markham. Taylor&Francis, 2006. 1197 p.
- Химический анализ лекарственных растений; под ред. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. М.: Высшая школа, 1983. 176 с.
- Hollman P.C.H., Arts C.W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden // *J. Sci. Food Agric.* 2000. V. 80, № 7. P. 1081-1093.
- Khanbabaee K., T. van Ree. Tannins: Classification and definition // *Nat. Prod. Rep.* 2001. V. 18. P. 641-649.
- Weingerl W. A comparative study of analytical methods for determination of polyphenols in wine by HPLC/UV-Vis, spectrophotometry and chemiluminometry // *Macro to nano spectroscopy*. Ed. J. Uddin. Ch. 17. InTech, 2012. P. 357-370.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53, № 10. P. 4290-4302.
- Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds // *Molecules*. 2013. V. 18. P. 2328-2375.
- Robards K., Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review // *Analyst*. 1997. V. 122. P. 11R-34R.
- Ignat I., Volf I., Popa V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables // *Food Chem.* 2011. V. 126, № 4. P. 1821-1835.
- Porgali E., Büyüktüncel E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods // *Food Res. Intern.* 2012. V. 45, № 1. P. 145-154.
- Escarpa A., González M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods // *Anal. Chim. Acta*. 2011. V. 427, № 1. P. 119-127.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods in enzymology*. 1999. V. 299. P. 152-178.
- Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation // *Phytochemistry*. 1969. V. 8. P. 445-462.
- A comprehensive review of CUPRAC methodology / Özyrek M. [et al.] // *Anal. Meth.* 2011. V. 3. P. 2439-2453.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239, № 1. P. 70-76.
- Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent // *Nature Protocols*. 2007. V. 2, № 4. P. 875-877.
- Wu H. Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances // *J. Biol. Chem.* 1920. V. 43. P. 189-220.
- Поп М.С. Гетерополи- и изополиоксометаллаты. Новосибирск: Наука, 1990. 227 с.
- Contant R., Ciabrini J.-P. Stereospecific preparations of new n-molybdo-(18-n)-tungsto-2-phosphates and related "defect" compounds (n=2, 4 or 5) // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1981. № 43. P. 1525-1528.
- Briand L.E., Valle G.M., Thomas H.J. Stability of the phospho-molybdic Dawson-type ion $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ in aqueous media // *J. Mater. Chem.* 2002. V. 12. P. 299-304.
- Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine / A.V. Bulatov [et al.] // *Talanta*. 2012. V. 96. P. 62-67.
- Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system / A.B. Vishnikin [et al.] // *Anal. Lett.* 2011. V. 44, № 1-3. P. 514-527.
- Simultaneous determination of two active components of pharmaceutical preparations by sequential injection method using heteropoly complexes / M.K.E.A. Al-Shwaiyat [et al.] // *Вестник Днепропетровского национального университета. Серия химическая*. 2014. Т. 22, № 1. С. 16-22.
- Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect / A.B. Vishnikin [et al.] // *Talanta*. 2012. V. 96. P. 230-235.
- Денисенко Т.А., Цыганок Л.П., Вишник А.Б. Спектрофотометрическое определение кверцетина и суммы полифенолов с использованием 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса // *Методы и объекты химического анализа*. 2014. Т. 9, № 3. С. 130-138.
- Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products / Georgé S. и [др.] // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53, № 5. С. 1370-1373.

REFERENCES

- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutrition*, 2000, vol. 130, no. 8, pp. 2073-2085.
- Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. O.M. Andersen, K.R. Markham (Ed.). Taylor&Francis, 2006. 1197 p.
- Khimicheskii analiz lekarstvennykh rastenii* [Chemical analysis of medicinal plants] Grinkevich N.I., Safronich L.N. (Ed.). Moscow, Vysshaya shkola, 1983. 176 p (in Russian).
- Hollman P.C.H., Arts C.W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, vol. 80, no. 7, pp. 1081-1093. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G.
- Khanbabaee K., T. van Ree. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.*, 2001, no. 18, pp. 641-649. doi: 10.1039/b101061l.
- Weingerl W. A comparative study of analytical methods for determination of polyphenols in wine by HPLC/UV-Vis, spectrophotometry and chemiluminometry. In: *Macro to nano spectroscopy*. Ed. J. Uddin., Ch. 17. 2012, pp. 357-370.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 10, pp. 4290-4302. doi: 10.1021/jf0502698.
- Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 2013. vol. 18, pp. 2328-2375. doi: 10.3390/molecules18022328.
- Robards K., Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, 1997. vol. 122. pp. 11R-34R. doi: 10.1039/A606499J.
- Ignat I., Volf I., Popa V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 2011, vol. 126, no. 4, pp. 1821-1835. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026.
- Porgali E., Büyüktüncel E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric

- methods. *Food Research International*, 2012, vol. 45, no. 1, pp. 145-154. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.025.
12. Escarpa A., González M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta*, 2011, vol. 427, no. 1, pp. 119-127. doi: 10.1016/S0003-2670(00)01188-0.
13. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152-178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
14. Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation. *Phytochemistry*, 1969, vol. 8, pp. 445-462. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85447-3.
15. Özyrek M., Güçlü K., Tütem E., Başkan K.S., Erçağ E., Çelik S.E., Baki S., Yıldız L., Karaman Ş., Apak R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Meth.*, 2011, vol. 3, pp. 2439-2453. doi: 10.1039/C1AY05320E.
16. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay. *Anal. Biochem*, 1996, vol. 239, no. 1, pp. 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
17. Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 4, pp. 875-877. doi: 10.1038/nprot.2007.102.
18. Wu H. Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances. *J. Biol. Chem.*, 1920, vol. 43, pp. 189-220.
19. Pop M.S. *Geteropoli- i izopolioksometalaty* [Heteropoly- and Isopolyoxometalates]. Novosibirsk, Nauka Publ., 1990. 227 p. (in Russian).
20. Contant R., Ciabrini J.-P. Stereospecific preparations of new n-molybdo-(18-n)-tungsto-2-phosphates and related “defect” compounds (n=2, 4 or 5). *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1981, vol. 43, no. 7, pp. 1525-1528. doi: 10.1016/0022-1902(81)80330-2.
21. Briand L.E., Valle G.M., Thomas H.J. Stability of the phospho-molybdic Dawson-type ion $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ in aqueous media. *J. Mater. Chem*, 2002, vol. 12, pp. 299-304. doi: 10.1039/b106769a.
22. Bulatov A.V., Petrova A.V., Vishnikin A.B., Moskvina A.L., Moskvina L.N. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine. *Talanta*, 2012, vol. 96, pp. 62-67. doi: 10.1016/j.talanta.2012.03.059.
23. Al-Shwaiyat M.K.E.A., Denisenko T.A., Zaruba S.V., Vishnikin A.B., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Y.R. Simultaneous determination of two active components of pharmaceutical preparations by sequential injection method using heteropoly complexes. *Vestnik Dnepropetrovskogo natsional'nogo universiteta. Seriya khimicheskaya* [Bulletin of Dnipropetrovsk National University. Series Chemistry], 2014, vol. 22, no. 1, pp. 16-22. doi: 10.15421/081408.
24. Vishnikin A.B., Al-Shwaiyat M.K.E.A., Petrushina G.A., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Y.R., Sklenařova H., Solich P. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect. *Talanta*, 2012, vol. 96, pp. 230-235 (in Russian). doi: 10.1016/j.talanta.2012.02.049.
25. Vishnikin A.B., Sklenařova H., Solich P., Petrushina G.A., Tsiganok L.P. Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system. *Anal. Lett.* 2011, vol. 44, no. 1-3, pp. 514-527. doi: 10.1080/00032719.2010.500789.
26. Denisenko T.A., Tsiganok L.P., Vishnikin A.B. [Spectrophotometric determination of quercetin and sum of polyphenols with 18-molybdodiphosphoric heteropoly complex]. *Metody i ob`ekty khimicheskogo analiza* [Methods and objects of chemical analysis], 2014, vol. 9, no. 3, pp. 130-138 (in Russian).
27. Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 5, pp. 1370-1373. doi: 10.1021/jf048396b.